



## بررسی اثر ضد سرطانی سیر تازه و مانده

فاطمه تاجی<sup>۱</sup>، محمود رفیعیان<sup>۲</sup>، رضا مقصودی<sup>۳</sup>، هدایت الله شیرزاد<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی تکوینی جانوری، دانشگاه خوارزمی تهران

<sup>۲</sup> گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

<sup>۳</sup> گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

(دریافت مقاله: ۹۰/۴/۸ - پذیرش مقاله: ۹۰/۵/۱۶)

### چکیده

**زمینه:** محتوای سیر با داشتن آنزیم‌هایی همچون آلیناز به مرور زمان در حال تغییر است. در این تحقیق اثر سیر سه ماه مانده در مقایسه با سیر تازه بر روی رشد سلول‌های فیروسارکوما در موش Balb/c مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مداخله‌ای، تعداد ۴۰ موش Balb/c ماده inbred به‌طور تصادفی به ۵ گروه، تقسیم شدند. سلول‌های WEHI 164 در زیر پوست ناحیه‌ی سینه‌ی حیوان تزریق شد. دو هفته قبل و سه هفته بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، 2 cc/ نرمال سالین (NS) یا ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌های سیر تازه یا سه ماه مانده به‌روش تزریق داخل صفاقی (IP) به موش‌ها تزریق شد. ۵ روز بعد از تزریق سلول‌ها، تا روز ۲۱ هر دو روز یک‌بار مساحت تومورها، اندازه‌گیری و با آزمون ANOVA با یکدیگر مقایسه شدند. مقدار ترکیبات فنولی و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیز اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** مقدار فنول کل در سیر تازه ۱۲/۶۱ میلی‌گرم بر گرم و در سیر سه ماه مانده ۸۹/ میلی‌گرم بر گرم بود. کارایی سیر تازه (۳۵/۶۳) در مقایسه با سیر سه ماه مانده (۱۰/۲) در پیشگیری از اکسیداسیون بیشتر بود ( $P < ۰/۰۵$ ). میانگین اندازه‌ی تومورها در گروه‌هایی که سیر تازه را دریافت کرده بودند، کوچکتر از گروه کنترل بود و با گذشت زمان بیشتر می‌شد به گونه‌ای که اختلافی معنی‌دار در گروه‌های نام‌برده در روزهای ۱۷، ۱۹ و ۲۱ دیده شد ( $P = ۰/۰۰۱$ ). تزریق سیر سه ماه مانده، تأثیری در مهار رشد سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل نداشت ( $P = ۰/۶۱$ ).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان داد که مصرف سیر، ممکن است نقش مهمی در کنترل و جلوگیری از رشد فیروسارکوما داشته باشد. این اثر ضد توموری سیر با گذشت زمان کاهش می‌یابد، بنابراین مصرف سیر تازه توصیه می‌شود.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های سرطانی، موش Balb/c، سیر، فیروسارکوما

## مقدمه

بدخیمی سلول‌های فیروپلاستیک در زمینه‌ای از کلاژن، مقدمه‌ای برای ایجاد فیروسارکوما می‌باشد. این تومور دارای منشأیی از سلول‌های مزانشیمال است که در زمان تشخیص، بی‌نهایت بزرگ است و فاسیای عضله را درگیر می‌کند (۱).

یکی از روش‌های درمانی برای فیروسارکوم استفاده از پرتو درمانی است، که از رشد سریع سلول‌های سرطانی، جلوگیری می‌کند و مرگ آنها را سبب می‌شود (۱ و ۳). عوارضی همچون ریزش مو، تهوع، استفراغ، خارش پوست و افزایش احتمال ابتلا به عفونت، از جمله پیامدهای روش‌های درمانی معمول (جراحی، قطع اندام، پرتو درمانی و شیمی درمانی) هستند (۴). این در حالی است که غیرتهاجمی و مؤثر بودن روش‌های بیولوژیکی، امری شناخته شده است (۵). از جمله روش‌های مورد بررسی و مؤثر در درمان سرطان‌ها، ایمنی درمانی (تقویت سیستم ایمنی) است (۵).

به نظر می‌رسد یکی از گیاهان مؤثر در تقویت سیستم ایمنی، گیاه سیر باشد. سیر، با داشتن پیازهای مرکب و گل آذین چتری در رأس خود در تیره‌ی لیلیاسه<sup>۱</sup> قرار گرفته است (۶). ترکیبات گوگردی موجود در این گیاه از اسید آمینه‌ای به نام آلئین<sup>۲</sup>، حاصل می‌گردد که در هنگام خرد شدن، تحت اثر آلیناز، آلیسین تولید می‌نماید (۷). اثرات معرق، خلط‌آور، ضد اسپاسم، ضد ویروس، ضد عفونی کننده بودن، پایین آورندگی فشار خون، ضد مالاریا، اشتهاآور و صفراآور بودن به سیر نسبت داده شده است (۶، ۸ و ۹).

سیر حاوی ترکیبات ارگانوسولفور (۱۰)، دی آلیل

(۱۱) و سلنیوم (۱۲) است. پایداری آلیل تیوسولفینات‌های<sup>۳</sup> موجود در سیر تازه در دمای ۸۰ درجه نشان داده شده است (۱۳). اثر برخی از سبزیجات همچون سیر و پیاز در برخی از انواع سرطان، اثبات شده است (۱۴ و ۱۵). تعدیل پاسخ ایمنی (۱۶ و ۱۷) با افزایش و تکثیر سلول‌های T (18) (T-cell) و سلول‌های طبیعی کشنده (۱۹ و ۲۰) از طریق عصاره‌ی سیر، و نیز افزایش پاسخ حساسیت تأخیری با کاربرد دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی سیر نشان داده شده است (۲۱). زمینه‌ی ابتلا به سرطان کولون و یا سرطان معده، با مصرف سیر، کاهش می‌یابد که به اثر آنتی‌اکسیدان سیر، نسبت داده شده است (۲۲-۲۴).

امروزه نیاز به روش‌های درمانی جدید، به علت مؤثر نبودن روش‌های درمانی موجود، کاملاً مشهود می‌باشد. با توجه به اثرات ضد توموری و ضد متاستازی سیر در برخی از انواع سرطان‌ها، به نظر می‌رسد که این ماده بر فیروسارکوم نیز مؤثر باشد (۱۰). ولی تحقیقات زیادی بر اثر ضد سرطانی اشکال مختلف از جمله سیری که مدت زمانی مانده باشد صورت نگرفته است. همچنین این احتمال وجود دارد که سیر با گذشت زمان اثر مهاري خود را بر رشد سلول‌های سرطانی از دست بدهد (۱۰).

بنابراین این بررسی، با هدف تعیین اثر دو نوع عصاره‌ی سیر، شامل سیر تازه و سیر سه ماه مانده، بر رشد فیرو سارکوما‌ی WEHI 164 در موش‌های ماده‌ی inbred نژاد Balb/c انجام شد. همچنین با توجه به احتمال اثر آنتی‌اکسیدانی سیر بر سرطان و ارتباط بین ترکیبات فنولی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن،

<sup>1</sup> Liliaceae<sup>2</sup> Allicine<sup>3</sup> Thiosulfonates

در نهایت میزان ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی سیر تازه و سه ماه مانده اندازه گیری شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه سیر

در این بررسی مداخله‌ای، بوته‌های سیر تازه یا سیر سه ماه مانده کاشت منطقه‌ی فریدون شهر اصفهان، بعد از تمیز کردن، خرد (له) و برای عصاره‌گیری استفاده گردید. ۵۰ گرم از سیر تازه یا سیر سه ماه مانده را خرد و در بالن یک لیتری ریخته و مقدار ۴۰۰ سی‌سی الکل اتیلیک ۹۶ درجه، به آن اضافه و سپس به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه تکان دهنده، قرار داده شد. عصاره‌ی حاصل صاف و بر روی تفاله‌ی باقی مانده، الکل اتیلیک ۷۰ درصد ریخته و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه تکان دهنده، قرار داده شد و دوباره عصاره‌ی به دست آمده صاف و به عصاره‌ی اول اضافه شد. بعد از آن عصاره در دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۴۵-۴۰ درجه و دور چرخش ۷۰ تقطیر شد، تا زمانی که حجم باقی مانده، به یک پنجم حجم اولیه رسید. در این حالت مخزن عصاره، از دستگاه جدا و عصاره‌ی باقی مانده در ظرف پتری با وزن معلوم، ریخته و در دمای ۵۰ درجه در دستگاه آون، خشک و وزن آن اندازه‌گیری شد (۲۵). میزان عصاره‌ی خشک حاصل، ۳ گرم بود. عصاره‌ها تا زمان استفاده، در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد، نگهداری شدند (۲۶).

برای تعیین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌های سیر ابتدا در یک لوله‌ی آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر کلروفرم، ۵ میلی‌لیتر بتا کاروتن (۰/۲ میلی‌گرم)، ۲۰ میلی‌لیتر لینولیک اسید (۲۰ میلی‌گرم) و ۰/۲ میلی‌لیتر توئین ۴۰ (پلی اکسی اتیلن سوربیتان مونوپالمیتات) (۲۰۰)

میلی‌گرم) با یگدیگر ترکیب شدند. سپس لوله در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه به منظور زدودن کلروفرم انکوبه شد. محلول حاصل با آب دو بار تقطیر، رقیق و ۴ میلی‌لیتر aliquots از این محلول با نمونه‌ها به شکل زیر ترکیب شد. کنترل شامل ۰/۲ میلی‌لیتر اتانول و ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه‌ی تهیه شده طبق توضیح فوق بود. محلول تست شامل ۰/۱۵ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه‌ی تهیه شده طبق توضیح فوق و ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی سیر بود. در طول موج ۴۷۰ نانومتر جذب نوری کنترل مانند نمونه‌ی استاندارد و عصاره در زمان دقیقه  $t=0$  و سپس با یک و نیم ساعت فاصله در دقیقه  $t=90$  ثبت شد. نمونه‌ها در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در بن ماری انکوبه شدند. فعالیت آنتی اکسیدان بر اساس توانایی نمونه‌ها در جلوگیری از شستن بتا کاروتن ارزیابی شد. فعالیت آنتی اکسیدان با استفاده از فرمول زیر ارزیابی شد (۲۷).

$$AA=100 [1-(A_o-A_t)/(A_{oo}-A_{ot})]$$

$A_o$  جذب نوری نمونه در دقیقه  $t=0$  و دقیقه  $t=90$   
جذب نوری نمونه در زمان  $A_{oo}$  and  $A_{ot}$   
نماینده جذب نوری در نمونه‌ی کنترل به ترتیب در زمان دقیقه  $t=0$  و  $t=90$  میزان ترکیبات فنولی کل، بر اساس روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتیو<sup>۵</sup> و بر حسب اسیدگالیک، اندازه‌گیری شد (۲۸). ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۲/۵، ۵، ۵۰، ۶۵/۲۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ ppm از اسید گالیک در محلول ۶۰ درصد متانول تهیه شد. آنگاه از هر یک ۰/۱ میلی‌لیتر به لوله آزمایش منتقل و به آنها ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد واکنش گر فولین-سیوکالتیو اضافه

<sup>5</sup> Folin-Ciocalteu's

<sup>4</sup> Polyoxyethylene monopalmitate

و پس از ۳ الی ۸ دقیقه به آن ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. آنگاه لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، نگهداری و پس از آن میزان جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر و در سه تکرار اندازه‌گیری شد، سپس ۰/۰۲ گرم از نمونه‌ی خشک شده‌ی عصاره‌ها را در متانول ۶۰ درصد حل کرده و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده و بر اساس روش فولین-سیوکالتیو میزان فنول کل، تعیین شد. با این تفاوت که به جای محلول استاندارد ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره اضافه شد. آنگاه بر اساس میزان جذب خوانده شده، مقدار فنول کل برحسب میلی‌گرم بر گرم عصاره به دست آمد (۲۸).

در این پژوهش تجربی ۵ گروه ۸ تایی از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/c ماده، خالص و با سن و جنس یکسان در محدوده‌ی وزنی  $20 \pm 2$  گرم، به شرح زیر وارد مطالعه شدند.

گروه‌های یک، سه و پنج، قبل و بعد از تزریق سلول‌های سرطانی به ترتیب نرمال سالین<sup>۶</sup>، عصاره‌ی سیر تازه و عصاره‌ی سیر سه ماه مانده را دریافت کردند.

گروه یک (کنترل) دو هفته قبل و سه هفته بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، نرمال سالین به صورت داخل صفاقی<sup>۷</sup> دریافت داشتند. گروه‌های دو و چهار، قبل از تزریق سلول‌های سرطانی نرمال سالین و بعد از تزریق سلول‌های سرطانی به ترتیب عصاره‌ی سیر تازه و عصاره‌ی سیر سه ماه مانده را دریافت کردند.

رده‌ی سلولی فیبروسارکوما از انستیتو پاستور تهران تهیه و در محیط DMEM حاوی ده درصد FCS حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور CO2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده

شد، با پرشدن سطح فلاسک تا سطح ۸۰ درصد، پاساژ سلول‌ها انجام گردید. به موش‌های هر گروه تعداد پانصد هزار سلول توموری فیبروسارکومای WEHI 164، در زیر پوست ناحیه‌ی سینه‌ی حیوان تزریق گردید (۲۹ و ۳۰). تومورها از روز پنجم بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، اندازه‌گیری شدند. اندازه‌ی قطر تومور با استفاده از یک کولیس با دقت بالا، در طول مدت سه هفته در ۹ نوبت هر دو روز یک‌بار اندازه‌گیری شد. محاسبه‌ی میانگین مساحت تومور از طریق اندازه‌گیری قطر تومور در دو جهت عمود بر هم، جمع شد و حاصل آن تقسیم به عدد ۴ و به توان دو رسید و سرانجام، ضرب عدد حاصله در ۳/۱۴ انجام گرفت (۲۹). در پایان این آزمایش موش‌ها با قطع نخاع کشته شدند.

در پایان، موش‌ها قطع نخاع شده، سپس ناحیه‌ی سینه‌ی موش‌ها در محلی که تومور رشد کرده بود با تیغ جراحی برش داده شد و تکه‌های کوچک ۱ تا ۲ میلی‌متری از آنها برداشته شد. سپس، برش‌های تهیه شده از بافت‌های توموری مربوط به هر گروه، به طور جداگانه در پتری دیش‌هایی که نام و کد هر موش روی آن نوشته شده بود و حاوی محلول فرمالین ۱۰ درصد بود، به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. برای انجام بقیه مراحل کار و تهیه‌ی لام‌های میکروسکوپی، این نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکزی شهرکرد، منتقل شدند و سایر مراحل مربوط به تهیه‌ی لام‌های میکروسکوپی، تحت نظر متخصص مربوطه صورت پذیرفت.

### ثابت کردن، آگیری، آغشته‌سازی

تکه‌های کوچک ۱ تا ۲ میلی‌متری در داخل محلول‌های ثابت کننده، قرار گرفتند. این محلول‌ها به دلیل پیوند با پروتئین‌ها، باعث غیرفعال شدن آنزیم‌ها شده و از انهدام

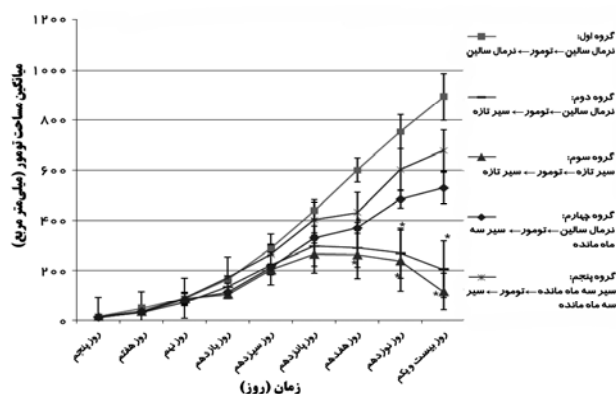
<sup>۶</sup> Normal Saline

<sup>۷</sup> Intrapritoneal

با توجه به نرمال بودن مقادیر به دست آمده از آزمون پارامتری (ANOVA 32) استفاده شد.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از رشد سلول‌های سرطانی WEHI 164 در موش Balb/c در گروه‌های دریافت کننده‌ی سیر تازه نشان داد که میانگین مساحت تومورها، در روزهای ۱۷، ۱۹ و ۲۱ بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، نسبت به گروه کنترل، کاهش یافته است ( $P=0/001$ ). همچنین مقایسه‌ی گروه‌های دریافت کننده‌ی سیر تازه (گروه‌های دوم و سوم) با یکدیگر نشان داد که در هیچ یک از روزهای مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه، وجود ندارد ( $P=0/64$ ). مقایسه‌ی میانگین مساحت تومورها، در گروه‌های چهارم و پنجم (گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره‌ی سیر سه ماه مانده) با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P=0/61$ ). مقایسه‌ی گروه‌های چهارم و پنجم (گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره‌ی سیر سه ماه مانده) با یکدیگر و همچنین با گروه‌های دوم و سوم (گروه‌های دریافت کننده‌ی سیر تازه) نشان داد که در هیچ‌یک از روزهای اندازه‌گیری مساحت تومور، بین آنها تفاوتی وجود ندارد ( $P=0/7$ ). (نمودار ۱).



نمودار ۱) اختلاف روند رشد سلول‌های سرطانی (تومور) در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی سیر تازه‌ی خام و سیر سه ماه مانده (هم در طول کل دوره و هم در دوره‌ی بعد از تزریق سلول‌های سرطانی)

ساختمان سلول‌ها و بافت‌ها جلوگیری می‌کنند. ثابت (فیکس) کردن توسط دستگاه فیکساتور که دارای دوازده ظرف، به ترتیب شامل فرمالین ۱۰ درصد، فرمالین ۱۰ درصد، الکل ۷۰ درصد، الکل ۸۰ درصد، الکل ۹۰ درصد، الکل ۱۰۰ درصد، الکل ۱۰۰ درصد، گزیلول<sup>۸</sup>، پارافین جامد است، انجام شد. در مرحله‌ی آگیری، به منظور خارج کردن آب درون بافت‌ها، نمونه‌ها را به ترتیب در الکل ۵۰ درصد، ۷۰ درصد و ۹۰ درصد خالص قرار دادیم تا آب بافت جذب الکل شده و الکل جایگزین آن شود، سپس نمونه را در داخل محلولی به نام گزیلول قرار دادیم تا آن هم جایگزین الکل شود. در مرحله آغشته‌سازی، نمونه را در داخل پارافین مذاب قرار دادیم تا به داخل بافت، نفوذ کند (۳۱).

### تهیه‌ی برش‌های نازک

در این مرحله نمونه‌های قالب‌گیری شده با پارافین، توسط میکروتوم به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرون برش داده شد (۳۱).

### رنگ‌آمیزی

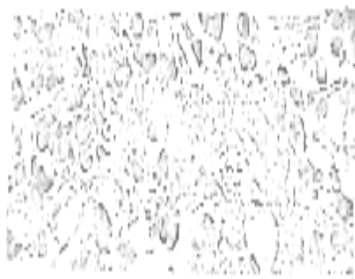
به دلیل ساده و معمول بودن روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، این نوع رنگ‌آمیزی، انتخاب و انجام شد (۳۱).

### بررسی ویژگی‌های بافت‌شناسی لام‌های تهیه شده از نمونه‌های توموری

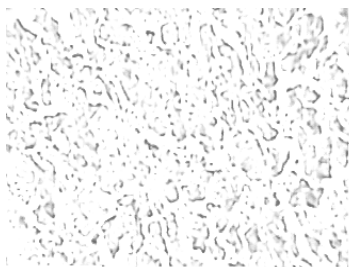
لام‌های تهیه شده از نمونه‌های توموری، زیر نظر متخصص پاتولوژی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند و ویژگی‌ها و تفاوت‌های مورفولوژیکی آنها، گزارش شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، پس از ۹ نوبت اندازه‌گیری در ۵ گروه با استفاده از نرم‌افزار SPSS (USA, IL, Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۱/۵ و

<sup>8</sup> Xylol

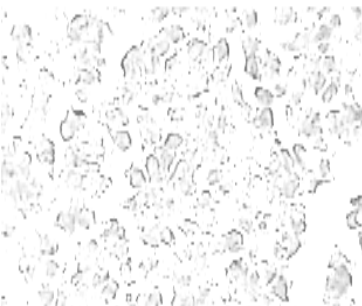
اشکال ۵-۱ تصاویر میکروسکوپی مربوط به مقاطع بافتی حاصل از بررسی تومورها در نمونه‌های موشی، در گروه‌های مورد مطالعه هستند.



شکل ۱) مقطع میکروسکوپی از نمونه بافت توموری، در موش‌هایی که قبل و بعد از تزریق سلول‌های سرطانی نرمال سالین دریافت کردند (بزرگ‌نمایی ۴۰۰X).  
پرخونی، خون‌ریزی و نکروز بسیار کم در نواحی مرکزی تومور، درصد نکروز شدگی ناچیز در تومور دیده می‌شود، در اطراف عروق، سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای به تعداد کم دیده می‌شود.



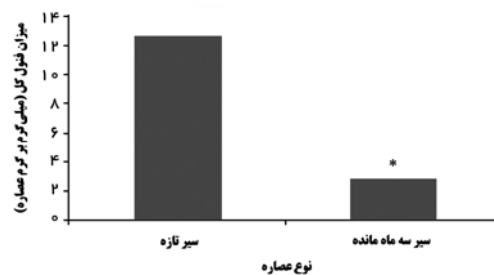
شکل ۲) مقطع میکروسکوپی از نمونه بافت توموری، در موش‌هایی که در طول دوره قبل از تزریق سلول‌های سرطانی نرمال سالین و در طول دوره بعد از تزریق سلول‌های سرطانی سیر تازه خام را دریافت کردند (بزرگ‌نمایی ۴۰۰X).  
پرخونی، ادم، اتساع عروق لنفاوی در ناحیه هیپودرم، خون‌ریزی در نواحی نکروز شده مشاهده شد، تقریباً تومور به‌میزان ۷۰ درصد دچار نکروز شده بود و میزان زیادی انعقاد داخل عروقی منتشر مشاهده شد.



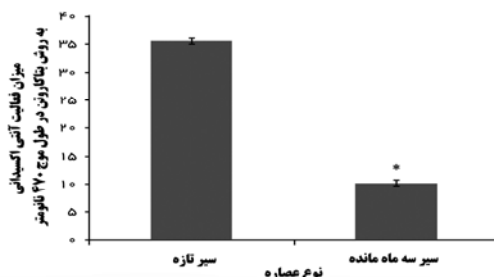
شکل ۳) مقطع میکروسکوپی از نمونه بافت توموری در موش‌هایی که در طول کل دوره (قبل و بعد از تزریق سلول‌های سرطانی) سیر تازه خام را دریافت کردند (بزرگ‌نمایی ۴۰۰X).  
میزان نکروز شدگی ۷۵ تا ۸۰ درصد، مشاهده ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها

بین گروه اول با گروه‌های چهارم و پنجم، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P=0/06$ ). همچنین مقایسه‌ی مساحت تومورها در دو گروه چهارم و پنجم اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P=0/06$ ). از نظر آماری بین گروه‌های دوم و سوم (دریافت کننده‌ی سیر تازه) با گروه‌های چهارم و پنجم (دریافت کننده‌ی سیر سه ماه مانده) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P=0/06$ ). نقاط رسم شده به‌صورت  $Mean \pm SE$  مساحت تومور در روزهای اندازه‌گیری هستند.

طبق مدل بتا کاروتن لینولات<sup>۹</sup> نشان داده شد که میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ی سیر تازه ( $35/63$ )، بیشتر از عصاره‌ی سیر سه ماه مانده ( $10/2$ ) بود ( $P<0/05$ ) (نمودار ۲). همچنین مقایسه‌ی میزان فنول موجود در عصاره‌ها نشان داد که میزان این ترکیبات در سیر تازه بیشتر ( $12/61$ ) میلی‌گرم بر گرم از عصاره‌ی سیر سه ماه مانده ( $2/89$ ) میلی‌گرم بر گرم بود ( $P<0/05$ ) (نمودار ۳).



نمودار ۲) ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو نوع عصاره‌ی سیر به‌روش بتاکاروتن  
میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ی سیر تازه ( $35/63$ )، بیشتر از عصاره‌ی سیر سه ماه مانده ( $10/2$ ) بود.



نمودار ۳) محتوای فنولی دو نوع عصاره‌ی سیر  
میزان ترکیبات فنولی سیر تازه ( $12/61$ ) میلی‌گرم بر گرم بیشتر از سیر سه ماه مانده ( $2/89$ ) میلی‌گرم بر گرم بود.

<sup>۹</sup>  $\beta$ -carotene- linoleate

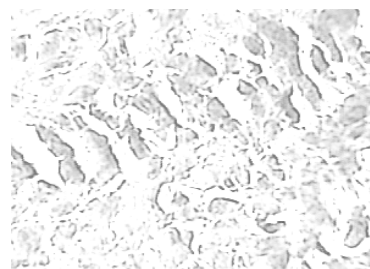
برخی از انواع سرطان‌ها به شکل‌های مختلف، بررسی شده که بین مصرف سیر و کاهش ابتلا به سرطان معده در انسان رابطه‌ی مثبتی دیده شده است (۲۴).

مطالعه‌ی استینمتز (Steinmetz) و همکاران کاهش خطر ابتلا به سرطان کولون را، در آمریکایی‌های مصرف کننده‌ی سیر، نشان داده است (۲۳). در مطالعه‌ی میلر (Miller) و بلمان (Belmon) و همکاران اثر مثبت ضدسرطان سیر و پیاز، نشان داده شد (۱۴ و ۱۵). در مطالعه‌ی لائو (Lau) و موریوکا (Morioka) و همکاران تعدیل‌کنندگی پاسخ ایمنی با مصرف سیر، نشان داده شده است (۱۶ و ۱۷).

مصرف عصاره‌ی سیر با افزایش و تکثیر سلول‌های T (T-cell) (۱۸) است و سلول‌های طبیعی کشته (NK) در سیستم ایمنی بدن تحت اثر پروتئین‌های مختلف دارای فعالیت سایتوتوکسیک هستند (۱۹) و (۲۰) همراه است. در مطالعه‌ی غضنفری، مصرف عصاره‌ی سیر تازه‌ی خام با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منجر به افزایش فعالیت سلول‌های طبیعی کشته، در موش Balb/c شد (۳۳).

مطالعه‌ی لئونارد (Leonard) و همکاران نشان داد که آنتی‌اکسیدان‌ها در میوه‌ها و سبزیجات فراوانند و توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد را دارند و می‌توانند آنها را به مولکول‌های بی‌ضرر، تبدیل کنند (۳۴). در مطالعات گوناگون اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، آنتی‌ترومبوز و ضدسرطان سیر نشان داده شده است (۱۳، ۲۱، ۳۵ و ۳۶).

به‌نظر می‌رسد حداقل قسمتی از اثرات ضدسرطانی سیر، می‌تواند ناشی از اثرات آنتی‌اکسیدانی آن باشد. مطالعه لانزاتی (Lonzotti) و همکاران نشان داده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیر به عواملی همچون فیبرهای تغذیه‌ای، میکروالمانت‌ها، به‌ویژه سلنیوم و پلی‌فنول‌ها



شکل ۴) نمونه بافت توموری، در موش‌هایی که در طول دوره‌ی قبل از تزریق سلول‌های سرطانی نرمال سالین و عصاره‌ی سیر سه ماه مانده را در دوره‌ی بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، دریافت کردند (بزرگ‌نمایی 400X). حضور دسته‌های درهم پیچیده‌ی فیبروبلاست‌های نابالغ و خون‌ریزی نکروز، ادم و تراوش سلول‌های آماسی و میزان نکروزشدگی بسیار کمی دیده شد.



شکل ۵) مقطع میکروسکوپی از نمونه‌ی بافت توموری در موش‌هایی که در طول دوره‌ی قبل و بعد از تزریق سلول‌های سرطانی عصاره‌ی سیر سه ماه مانده را دریافت کردند (بزرگ‌نمایی 400X). در اطراف مناطق نکروز شده سلول‌های آماسی ماکروفاژ و نوتروفیل دیده می‌شود که دال بر انعقاد داخل عروقی منتشر است (به‌میزان کم) و نکروز بسیار کمی مشاهده می‌شود.

## بحث

هدف مطالعه‌ی کنونی، بررسی تأثیر عصاره‌ی سیر تازه و سه ماه مانده، بر رشد فیبروسارکومای WEHI164 در موش Balb/c بود. نتایج نشان داد که میانگین مساحت تومورها، در گروه‌های دریافت کننده‌ی سیر تازه، در روزهای ۱۷، ۱۹ و ۲۱ بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، نسبت به گروه کنترل، کاهش یافته است ( $P=0/001$ ). میانگین مساحت تومورها، در گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره‌ی سیر سه ماه مانده، نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان نداد ( $P=0/61$ ).

بررسی‌های مشابهی که بدین شکل اثر دریافت عصاره‌های سیر سه ماه مانده و سیر تازه را بر رشد فیبروسارکوما بررسی کند، صورت نگرفته است، اما اثر گیاه سیر بر روی

وابسته است که اثر آنتی اکسیدانی دارند (۳۷). مطالعه‌ی پیگناتی (Pignatti) و همکاران بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های آبی حاصل از برگ‌ها و پیازهای سیر، نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدان گونه‌های سیر وحشی، با محتوای فنول کل آنها، مرتبط است (۳۸).

در بررسی کنونی، بالاتر بودن فعالیت آنتی اکسیدان سیر تازه، احتمالاً به دلیل بالا بودن ترکیبات فنولی موجود در آن در مقایسه با سیر سه ماه مانده است که اعمال خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتر از جانب سیر تازه را فراهم می‌کند. آنتی اکسیدان‌های موجود در سیر، توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد را دارند و می‌توانند آنها را به مولکول‌های بی‌ضرر، تبدیل کنند (۳۴). مطالعات نشان داده‌اند، رژیم با اثر آنتی اکسیدانی بالا و کالری محدود، منجر به کاهش شیوع تومورها، کاهش آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز می‌شود (۳۹).

با توجه به یافته‌های حاصل از بررسی میزان فنول عصاره‌ها و کم بودن میزان آن در عصاره‌ی سیر سه ماه مانده در مقایسه با عصاره‌ی سیر تازه، به نظر می‌رسد که احتمالاً کاهش تأثیر عصاره‌ی سیر سه ماه مانده در جلوگیری از رشد تومورها در مطالعه‌ی حاضر، به کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی سیر سه ماه مانده مرتبط بوده باشد. با توجه به مطالعات قبلی، به نظر می‌رسد که در مطالعه‌ی کنونی، با ماندن سیر برای مدت زمان سه ماه، اعمال اثر آنتی اکسیدانی از سوی ترکیبات فنولی موجود در آن به‌خاطر کاهش آنها، کم شده و این نوع سیر، قدرت اعمال ویژگی آنتی اکسیدانی را برای جلوگیری از رشد تومورها را در این مدت زمان ماندن، در مقایسه با سیر تازه، از دست داده باشد.

وجود نکروز بالا در گروه‌های دریافت کننده‌ی سیر تازه در مقایسه با گروه‌هایی که سیر سه ماه مانده را

دریافت کرده‌اند، نشان دهنده اثر بیشتر سیر تازه در جلوگیری از رشد تومورها است. بررسی ارتباط میان عصاره‌های سیر و ویژگی‌های ضدسرطانی یا تکثیر سلولی، نشان‌دهنده این است که اجزاء ارگانوسولفور مشتق از سیر دارای قدرت بالقوه ضدتوموری هستند (۴۰). مکانیسم‌های بیوشیمیایی اثرات ضدتکثیری و ضدتوموری اعمال شده از سوی این اجزاء، ناشناخته مانده‌اند.

چندین مدل حیوانی نشان داده‌اند که آلیل سولفیدها به‌طور ویژه دی‌آلیل سولفید، تری‌سولفید، آلیل متیل سولفید و آجوئن بر تعدیل فعالیت سیتوکروم‌ها اثر گذارند (۴۱ و ۴۲).

بر اساس داده‌های حاصل از مطالعات کشت سلولی و حیوانی برای بیان اثرات جلوگیری‌کننده سیر از سرطان، نظریه‌هایی ارائه شده که به بیان مکانیسم‌های کلی این اثرات پرداخته‌اند از جمله:

۱) اس‌آلیل سولفیدها مانند کلیدی برای افزایش سطوح درونزاد گلوکوتایون سولفیدریل و گلوکوتایون پراکسیداز عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها ماده ژنتیکی، پروتئین‌ها و لیپیدها را از آسیب‌های حاصل از استرس اکسیداتیو حفظ می‌کنند.

۲) از متابولیت‌های حد واسطه حاصل از سرطان‌زاهای شیمیایی جلوگیری می‌کنند.

۳) پاسخ‌های ایمنی را تحریک می‌کنند.

۴) متابولیت‌های حد واسطه که تغییردهنده چرخه سلولی و فاکتورهای آپوپتوزی هستند را متابولیزه می‌کنند.

در بین این مکانیسم‌ها تنظیم چرخه سلولی و سیگنال‌های آپوپتیک اهمیت قابل توجهی دارند و به نظر می‌رسد که در مطالعات آزمایشگاهی اساس و پایه اثرات ضدسرطانی سیر باشد. گرچه این اثرات در مدل‌های کشت سلولی قابلیت تجدید شدن را



با میزان نکروز شدگی کمتر و خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر آن در مقایسه با سیری که مدتی مانده، قابل توجیه است.

### سپاس و قدردانی

این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد استخراج گردیده است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که بودجه لازم جهت انجام این بررسی را فراهم نمودند، قدردانی نمایند.

دارند و بنابراین انجام مطالعات حیوانی، تأکید شده است. انجام مطالعاتی آتی که به بررسی مکانیسم های مرتبط با سایر اجزاء مشتق از این گیاه و اثرگذار بر روی فرایندهای فوق، می پردازد، نیز ضروری به نظر می رسد.

گرچه سیر دارای اثرات دارویی زیادی است اما این اثرات تحت فرایندهای گوناگون تغییر می یابند. یافته های این پژوهش نشان داد که عصاره الکلی سیر تازه، آنتی اکسیدانی قوی است و گذشت زمان می تواند بر خاصیت آنتی اکسیدانی سیر اثرگذار باشد. قدرت ضدتوموری سیر تازه در مدل حیوانی

### References:

1. Wong SL. Diagnosis and management of desmoid tumors and fibrosarcoma. *J Surg Oncol* 2008; 97: 554-8.
2. Loh ML, Ahn P, Perez-Atayde AR, et al. Treatment of infantile fibrosarcoma with chemotherapy and surgery: results from the Dana-Farber Cancer Institute and Children's Hospital, Boston. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 722-6.
3. Mirra JM, Marcove RC. Fibrosarcomatous dedifferentiation of primary and secondary chondrosarcoma. Review of five cases. *J Bone Joint Surg Am* 1974; 56: 285-96.
4. Kasper DL, Harrison TR, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16 ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub; 2005.
5. Mattil-Fritz S, Scharner D, Piuko K, et al. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. *J Gen Virol* 2008; 89: 138-47.
6. Ayenechi Y. *Medicinal Mophradat of Iran Drug Plants* [dissertation]. Tehran Univ., 1990.
7. Kabiri P. The possibility of omission of essence from garlic without deletion of its active compounds, *Pharm* [dissertation]. Tabriz Univ Med Sci., 1994.
8. Ang-Lee MK, Moss J, Yuan C-S. Herbal medicines and perioperative care. *JAMA* 2001; 286: 208-16.
9. Borek C. Garlic Reduces Dementia and Heart-Disease Risk. *J Nutr* 2006; 136: 810S-2S.
10. Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation Between Antioxidant Activity of Garlic Extracts and WEHI-164 Fibrosarcoma Tumor Growth in BALB/c Mice. *J Med Food* 2011; 14: 969-74.
11. Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Res* 1993; 53: 3493-8.
12. Ip C, Lisk DJ, Thompson HJ. Selenium-enriched garlic inhibits the early stage but not the late stage of mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1979-82.
13. Lawson LD, Gardner CD. Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 6254-61.
14. Miller JA, Miller EC. The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *Br J Cancer* 1983; 48: 1-15.
15. Belmon S. Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. *Carcinogenesis* 1983; 48: 1063-5.
16. Lau BHS, Yamasaki T, Gridley DS. Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions. *Mol Biother* 1991; 3: 103-7.
17. Morioka N, Sze LL, Moron DL, et al. A protein fraction from aged garlic extract enhances cytotoxicity and proliferation of human lymphocytes mediated by interleukin-

- 2 and concanavalin A. Cancer Immunol Immunother 1993; 37: 316-22.
18. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, et al. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-Infected BALB/c Mice. Scand J Immunol 2000; 52: 491-5.
19. Bargahi A, Rabbani Chadegani O, Mohammad Hasan Z. Effect of shark cartilage on the cytotoxic activity of NK cells immune system. ISMJ 2009; 12: 181-8.
20. Kandil OM, Abdullah TH, Elkadi A. Garlic and the immune system in humans: its effect on natural killer cells. Fed Proc 1987; 46: 441.
21. Gazanfari T, Zuhair MH. Evaluation of effect garlic on cell immunomodulatory, delay test hypertension. Shahed Univ Med Sci 1995; 7-8: 83-8.
22. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. Cancer Res 1994; 54: 2390-7.
23. Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, et al. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa women's health study. Am J Epidemiol 1994; 139: 1-15.
24. You WC, Blot WJ, Chang YS, et al. Diet and high risk of stomach cancer in Shandong, China. Cancer Res 1988; 48: 3518-23.
25. Samsam H. Extracting of assertive materials of herbs and method of their recognition and evaluation. Tehran: Mani Pub; 1992.
26. Baghalian K, Ziaei SA, Naghavi MR, et al. Evaluation of pre-culture of Iranian garlic echotypes from the allicin amounts point of view and their botanic characteristics. J Herb Med 2004; 13: 50-9.
27. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. Antioxidants in food - practical applications. 1st ed. Witney, Oxford: Woodhead Pub; 2001.
28. Singleton VL, Rossi JR JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16: 144-58.
29. Zuhair MH, Yaraee R, Zare N, et al. Immunomodulatory affect of R10 fraction of garlic extract on natural killer activity. Int Immunopharmacol 2003; 3: 1483-9.
30. Yousefi H. Evaluation of Lishmania major parazit infection on growth of WEHI 164 fibrosarcoma in Balb/c mice. Arak Univ Med Sci 2006; 10: 24-8.
31. Khalili-Alam Kh, Kadivar M, Zare-Mirzaie A. Comparing three types of staining methods: Hematoxylin & Eosin, Giemsa, and Hematoxylin & Eosin with prolonged Hematoxylin time in detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies of patients with chronic gastritis. J Iran Univ Med Sci 2004; 49: 39-44.
32. Kenuver M. Apply of nonparametric statistic. Tehran: Tehran University Pub; 2004.
33. Ghazanfari T, hassan ZM, ebrahimi M. Immunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. Int Immunopharmacol 2002; 2: 1541-9.
34. Leonard SS, Cutler D, Ding M, et al. Antioxidant properties of fruit and vegetable juices: more to the story than ascorbic acid. Ann Clin Lab Sci 2002; 32: 193-200.
35. Hajzadeh MR, Tavakol Afshari J, Ghorbani A, et al. The effects of aqueous extract of garlic (*Allium sativum* L.) on laryngeal cancer cells (Hep-2) and L929 cells, in vitro. J Med Plants 2006; 5: 41-8.
36. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. J Nutr 2001; 131: 1010S-15S.
37. Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. J Chromatogr 2006; 1112: 3-22.
38. Ahmad R, Ali AM, Israf DA, et al. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. Life Sci 2005; 76: 1953-64.
39. Hwang ES, Bowen PE. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: Its measurement and modulation by diet and environment. Crit Rev Food Sic Nutr 2007; 47: 27-50.
40. Pinto JT, Lapsia S, Shah A, et al. Antiproliferative effects of garlic-derived and other allium related compounds. In: Go VLW, editor. Nutrition and cancer prevention: new insights into the role of phytochemicals: advances in experimental medicine and biology. New York: Kluwer Academic-Plenum Publishers; 2001: p. 83-106.
41. Brady JF, Li DC, Ishizaki H, et al. Effect of diallyl sulfide on rat liver microsomal nitrosamine metabolism and other monooxygenase activities. Cancer Res 1988; 48: 5937-40.
42. Wargovich MJ, Woods C, Eng VW, et al. Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by naturally occurring thioether, diallyl sulfide. Cancer Res 1988; 48: 6872-5.

*Original Article*

# Anti-cancer effect of fresh and aged garlic

*F. Taji<sup>1</sup>, M. Rafieian<sup>2</sup>, R. Maghsodi<sup>3</sup>, H. Shirzad<sup>3\*</sup>*

<sup>1</sup> Department of Developmental Biology, Kharazmi University, Tehran, IRAN

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Medical Plants Research Center, ShahreKord University of Medical Sciences, ShahreKord, IRAN

<sup>3</sup> Department of Immunology, Medical Plants Research Center, ShahreKord University of Medical Sciences, ShahreKord, IRAN

(Received 29 Jun, 2011      Accepted 7 Aug, 2011)

### *Abstract*

**Background:** Garlic components may change due to its enzymes activity such as alliance. In this research the effect of three months old garlic on the growth of WEHI-164 fibrosarcoma cells was examined in comparison with fresh garlic in Balb/c mice.

**Material and Methods:** In this interventional study 40 female inbred Balb/c mice were designated into 5 groups. WEHI-164 cells were injected subcutaneously in the chest of animal. Two weeks before and three weeks after injection of cancer cells, 0.2 cc of normal saline or 20 mg/kg extracts of fresh or three months old garlic was injected intraperitoneally (IP) to mice. Five days after cells' injection until day 21, every other day, and the mean size of tumors was measured and compared with each other, using ANOVA test. The antioxidant potential of extracts and the amount of total phenolic were also measured.

**Results:** The amount of phenolic compounds in fresh garlic extract was 12.61mg/g and in three months old garlic was 2.89 mg/g. The efficiency of fresh garlic (35.63) was further compared with three month old garlic (10.2) in prevention of oxidation ( $p < 0.05$ ). The mean size of tumors in groups which received fresh garlic was smaller than that of control group. This tumor size was increased by time, so that a significant difference in mention groups could be seen on days 17, 19 and 21 ( $p = 0.001$ ). Injection of 3-months old garlic had no effect on inhibition of growth of cancer cells compared to control group ( $P = 0.61$ ).

**Conclusion:** Findings showed that garlic consumption might have important role in control and prevention of fibrosarcoma growth. But along with time the beneficial effect of garlic on cancer cells is reduced. Therefore, fresh garlic consumption is recommended.

**Keywords:** cancer cells, Balb/c mice, garlic, fibrosarcoma

\*Address for correspondence: Department of Immunology, Medical Plants Research Center, ShahreKord University of Medical Sciences, ShahreKord, IRAN; E-mail: shirzadeh@skums.ac.ir